

IAP20 Rec'd PCT/PTO 23 JUN 2006

**Verfahren zur Anreicherung und Stabilisierung von DNA-haltigen
Bestandteilen aus biologischen Materialien**

5 Die Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Anreicherung und Stabilisierung von DNA-haltigen Bestandteilen aus biologischen Materialien, insbesondere aus Blutproben. Die DNA-haltigen Probenmaterialien werden in einem Lyse-BindungspufferSystem partiell lysiert und die DNA-haltigen Bestandteile, wie z.B. Zellkerne, an eine funktionalisierte feste Oberfläche gebunden. Das System umfasst Lysereagentien und feste Adsorbentien, wobei die Oberflächen der Adsorbentien mit Polymeren aus polymerisationsfähigen Säuren oder deren Derivaten funktionalisiert sind, an die DNA-haltige Bestandteile binden. Als funktionalisierbare Trägermaterialien können organische oder anorganische feste Materialien dienen. Die restlichen Bestandteile des Probenmaterials werden abgetrennt. Anschließend können die gebundenen DNA-haltigen Bestandteile des Probenmaterials weiter aufgereinigt werden und die DNA wird nach an sich bekannten Techniken isoliert. Gegebenenfalls werden die DNA-haltigen Bestandteile des Probenmaterials unter einer bestimmten Ionenstärke von der Oberfläche abgelöst, eine Weiterbearbeitung kann jedoch auch direkt unter Einsatz der festphasengebundenen DNA-haltigen Bestandteile erfolgen. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung haben die festen Adsorbentien magnetische Eigenschaften und/oder die Gestalt von Mikropartikeln mit einem Durchmesser im Bereich von 1-100 µm.

25 Mit der Etablierung DNA-analytischer Methoden in der Laboratoriumspraxis, insbesondere der klinischen Analytik, haben Methoden zur Nukleinsäureaufreinigung eine rasante technologische Entwicklung durchlaufen. Besonderes Augenmerk gilt vor allem Nukleinsäureisolationsverfahren, die geeignet sind auf automatischen „Liquid Handling“-Systemen appliziert zu werden. Herausragend sind hier Festphasenextraktionskonzepte, die Adsorbentien mit magnetischen Eigenschaften nutzen, da durch die mögliche Manipulation dieser Adsorbentien mit magnetischen Feldern ein manuelles Eingreifen in den Extraktionsverlauf umgangen wird und der Prozess damit vollautomatisch gestaltet werden kann.

30

35 Gerade in der klinischen Analytik, etwa der Untersuchung des *Major Histocompatibility Complexes* (MHC, HLA Analytik) wird eine bestimmte

Mindestmenge und –konzentration von DNA nach der Isolation erwartet, die den Einsatz relativ großer Mengen an Probenmaterial erforderlich macht. Das automatische Extrahieren dieser relativ großen Probenmengen ist jedoch problematisch, da die zur Verfügung stehenden Pipettierroboter nicht in jedem Fall 5 in der Lage sind die erforderlichen Volumina effektiv zu bearbeiten. Das gilt insbesondere für die DNA-Isolierung aus Blutproben, denn der zelluläre Anteil des Blutes besteht bekanntermaßen zum größten Teil aus roten Blutkörperchen (Erythrocyten). Diese sind aber für eine DNA-Isolierung ungeeignet, da sie keinen Kern besitzen, so dass lediglich die weißen Blutkörperchen, die Leukocyten, 10 interessant sind.

Zusätzlich entstehen bei der Lagerung von Blutproben mit großen Volumina häufig Platzprobleme. Hier behilft man sich zur Zeit u.a. mit der Lagerung von sogenannten *Buffy coats*, deren Herstellung jedoch ausschließlich manuell 15 erfolgen kann. Die nachfolgende Isolation von DNA aus *Buffy coats* kann sich aufgrund hoher Zellkonzentrationen schwierig gestalten. Ein weiteres Problem stellt die Instabilität der DNA-haltigen Bestandteile unmittelbar nach der Probenentnahme dar. Vollblut und *Buffy coat* müssen kühl gelagert werden, um einem DNA-Abbau vorzubeugen.

20 Dementsprechend wurden Strategien entwickelt, vor der eigentlichen DNA-Extraktion die DNA-haltigen Zellen bzw. die DNA-haltigen Bestandteile des Probenmaterials, insbesondere von Blut, anzureichern.

25 Entsprechende Verfahren sehen mehrere Arbeitsschritte vor. Zellen, aus denen DNA isoliert werden soll, werden z.B. durch Zentrifugation angereichert, anschließend lysiert, erneut zentrifugiert, danach wird das Lysat mit speziellen Trägern, die DNA binden, in Kontakt gebracht. Eine dieser Varianten zur Anreicherung DNA-haltiger Bestandteile besteht in der chemischen Lyse der 30 Zellen mittels sogenannter Lysepuffer für rote Blutzellen (*Red Cell Lysis Buffer*, RCB), der Pelletierung der DNA-haltigen Bestandteile des Blutes durch Zentrifugation und dem anschließenden Extrahieren der DNA aus diesem Pellet [Epplen & Lubjuhn (1999) DNA profiling and DNA fingerprinting, *Birkhäuser Verlag*, Berlin, S. 55].

35 Diese Verfahren sind nicht sehr automatisierungsfreundlich, da die Zentrifugationsschritte einer durchgehend automatisierten Extraktion von

Nukleinsäuren entgegenstehen. Die Integration von Zentrifugen in Robotersysteme ist zwar möglich, die Umsetzung ist jedoch außerordentlich kostenintensiv und technologisch schwer zu realisieren.

- 5 Ein anderer methodischer Ansatz nutzt die Affinität spezieller Antikörper gegen DNA-haltige Blutzellen (z.B. CD 4 Zellen). Diese Antikörper, gebunden an Magnetpartikel erlauben eine Aufkonzentrierung von DNA-haltigen Blutzellen und damit eine Verringerung des Volumens, welches in die eigentliche DNA-Isolation eingeht. Eine Variante zur Isolation von DNA-haltigen Blutzellen mittels an
- 10 Magnetpartikel gebundene spezifische Antikörper ist von Hardingham *et al.* beschrieben worden [Hardingham *et al.* (1993) *Cancer Research* 53, 3455-3458; Lundeberg & Larsen (1995) *Biotechnology Annual Review* 1, 373-401]. Nachteile des angeführten Verfahrens sind einmal der hohe Preis für die eingesetzten Magnetpartikel. Zum anderen versagt dieses Verfahren beim Einsatz von
- 15 gefrorenen Blutproben, wie er in der klinischen Praxis durchaus die Regel ist, da durch das Einfrieren und Auftauen des Probenmaterials die Zellen zerstört wurden und die Spezifität der Antikörper nicht mehr zum Tragen kommt.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Anreicherung und Stabilisierung von DNA-haltigen Bestandteilen aus biologischen Materialien, insbesondere aus Blut, zu entwickeln, wobei durch das Verfahren ProbenMaterialien bereitgestellt werden sollen, die eine nachfolgende einfache und vollautomatische DNA-Isolierung gestatten, und nachteilige große Probenvolumina und die DNA-Isolierung störende Zentrifugationsschritte vermeiden. Des weiteren soll eine stabile Lagerung der DNA im Probenmaterial unter günstigen Temperaturbedingungen erlaubt sein.

Die Aufgabe konnte erfindungsgemäß gelöst werden, indem biologische Materialien in einem ersten Schritt einer partiellen Lyse in Gegenwart von mindestens einem Lysereagenz und mindestens einem festen Adsorbens, das eine mit Polymeren funktionalisierte Oberfläche aufweist, unterworfen werden. Dabei binden die DNA-haltigen Bestandteile des Probenmaterials gleichzeitig an die feste Oberfläche, die erfindungsgemäß aus Polymeren, umfassend ein Trägerpolymer, vorzugsweise aus polymerisationsfähigen Säuren oder Derivaten

30 von polymerisationsfähigen Säuren, oder aus Polymeren, umfassend ein Gemisch aus vorgenanntem Trägerpolymer und anderen polymerisationsfähigen Säuren oder deren Derivaten, vorzugsweise ausgewählt aus Sulfonsäure, Phosphonsäure

35

oder Carbonsäure, besteht. Andere polymerisationsfähige Säuren oder deren Derivate umfassen solche polymerisationsfähigen Säuren oder deren Derivate, die in einer besonderen Ausführungsform der festen Oberfläche nicht mit jenen des Trägermaterials identisch sind, und werden in der vorliegenden Erfindung auch als 5 Säurekomponente bezeichnet. Nach der Abtrennung des Überstandes werden die gebundenen DNA-haltigen Bestandteile einer DNA-Isolierung nach an sich bekannten Verfahren zugeführt. Dazu können sie zunächst eluiert werden.

Es konnte in überraschender Weise festgestellt werden, dass nicht die freie DNA, 10 sondern DNA-haltige Bestandteile eines Lysats, das in sehr großem Umfang die intakten Bestandteile des Cytoplasmas, insbesondere die Zellkerne, wie z.B. die Leukozytenkerne des Blutes, enthält, an die funktionalisierten Oberflächen der festen Adsorbentien binden.

15 Die an die erfindungsgemäßigen Adsorbentien fixierten DNA-haltigen Bestandteile des Probenmaterials sind gegen degradierende enzymatische oder chemische Einflüsse geschützt und stabil, und sie können deshalb unkompliziert, insbesondere bei Raumtemperatur, gelagert bzw. transportiert werden.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren erleichtert besonders die Isolation von DNA aus großen Probenvolumina, denn diese ursprünglich großen Volumina, wie z.B. von Blutproben, werden auf die DNA-haltigen Bestandteile reduziert. Die Lagermöglichkeit an Probenmaterialien, aus denen anschließend die DNA isoliert werden soll, wird enorm verbessert.

25 Vorzugsweise bestehen die Oberflächenpolymere aus Trägerpolymeren aus Acrylsäure oder Methacrylsäure oder deren Derivaten, wie z.B. aus Acrylamid, Methacrylamid oder Acrylsäureestern.

30 Darüber hinaus können die polymeren Oberflächen als zweite Komponente polymerisierte Säuren, vorzugsweise Sulfon-, Phosphon- oder Carbonsäure, oder polymerisierte Derivate von polymerisationsfähigen Säuren, vorzugsweise Sulfon- oder Phosphonsäureverbindungen, besonders bevorzugt Vinylphosphonsäure, Vinylsulfonsäure oder deren Derivate, wie z.B. Styrensulfonsäure, enthalten.

35 Bevorzugt im Sinne der Erfindung sind Copolymeren aus einem Trägerpolymer und der Säurekomponente Sulfonsäure oder Vinylsulfonsäure.

Gegebenenfalls können weitere Monomerkomponenten mit einer polymerisierbaren Doppelbindung, wie z.B. Vinylacetat, vinylgruppenhaltige Silylverbindungen und Vinylstearat, verwendet werden. Besonders wertvoll ist die Verwendung letztgenannter Monomere zur Erzielung bestimmter Oberflächen-eigenschaften des Adsorbens, wie Benetzbarkeit oder Modifizierbarkeit.

Die Oberflächenpolymere sind im Fall von Copolymeren unter einem definierten Verhältnis der verschiedenen Monomere zusammengesetzt, in binären Systemen vorzugsweise im Verhältnis 9:1 bis 1:1 von Trägerpolymer zu Säurekomponente, 10 besonders bevorzugt im Verhältnis 9:1 bis 3:1.

Der Gehalt der polymerisationsfähigen Säurekomponente im Reaktionsgemisch liegt zwischen 10 % w/w und 50 % w/w, vorzugsweise zwischen 10 % w/w und 25 % w/w. Vorzugsweise haben die funktionalisierten Oberflächen Styrensulfonsäure 15 in einem Massenanteil zwischen 10 % w/w und 50 % w/w, besonders bevorzugt zwischen 10 % w/w und 25 % w/w.

Trägermaterialien für die erfindungsgemäßen Polymere können alle anorganischen oder organischen Materialien sein, die auf Grund ihrer chemischen 20 Eigenschaften eine Aktivierung gestatten. Ebenso können anorganische oder organische Materialien genutzt werden, die sich in die erfindungsgemäßen Polymere einbetten lassen, etwa durch Vernetzen löslicher Derivate von Polymeren. Dazu gehören z.B. Polystyren, Polysulfone, unmodifizierte oder modifizierte Kieselgele. Besonders eignen sich Hydroxylgruppen tragende 25 Polymere, wie z.B. Cellulose, ganz besonders geeignet sind Polyvinylalkohol-derivate. Weiterhin können Polyester, Polyamide, Polycarbonate usw. eingesetzt werden.

Die Verwendung der die Oberflächeneigenschaften der Adsorbentien 30 bestimmenden Polymere als Trägermaterialien ist ebenfalls möglich, sofern die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Materialien eine Handhabung in wässrigen Lösungen erlauben. In einer bevorzugten Verfahrensvariante bestehen die auf den Adsorbentienoberflächen aufgebrachten Polymere aus dem Trägermaterial und/oder Vinylsulfonsäuremonomeren, die in das lysierte 35 biologische Material eingebracht werden.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform dieser Erfindung bestehen die festen Trägermaterialien zur Anreicherung der DNA-haltigen Bestandteile aus Mikropartikeln mit magnetischen Eigenschaften, die sie durch Anlegen externer magnetischer Felder mechanisch manipulierbar machen. Besonders bevorzugt
5 werden Mikropartikel mit magnetischen Eigenschaften und einem Durchmesser im Bereich von 1-100 µm, vorzugsweise 1-30 µm, besonders bevorzugt 3-10 µm, eingesetzt. Solche Mikropartikel sind dem Fachmann bekannt. Ihre Herstellung erfolgt nach an sich bekannten Methoden, so wie beispielsweise in DE 43 07 262 und US 5,648,124 beschrieben.

10

Die Herstellung der zur erfindungsgemäßen Anreicherung notwendigen Adsorbentien kann z.B. durch die dem Fachmann hinlänglich bekannten Ppropfpolymerisationsverfahren, wie z.B. dem Aufbringen der Monomergemische auf mittels Peroxidradikalen aktivierte Oberflächen, erfolgen.

15

So lassen sich beispielsweise mit Dialdehyden vernetzte Polyvinylalkoholderivate mittels konzentrierter Lösung von Wasserstoffperoxid aktivieren [Bates & Shanks (1980) *J. Macromol. Science Chem.* A14, 137-151; Bolto *et al.* (1978) *J. Appl. Polym. Sci.* 2, 1977]. Ebenso ist eine Aktivierung der Basisoberfläche durch 20 partielle Oxidation mit Cer(IV)-ammoniumsulfat [Mukopadhyay *et al.* (1969) *J. Polym. Sci.* A-1 7, 2079] denkbar. Andere Aktivierungsverfahren sind die photochemische Aktivierung der Oberfläche durch Sensibilisatoren wie Benzophenon oder Methylenblau.

25

Des weiteren ist die chemische Anbindung der die Oberflächeneigenschaften der Adsorbentien bestimmenden Polymere über auf den festen Trägermaterialien befindliche sogenannte Ankergruppen möglich. So können beispielsweise die Polymere an Aminogruppen, die sich auf der Oberfläche der Trägermaterialien befinden, kondensiert werden. Dem Fachmann ist bekannt, wie Aminogruppen auf 30 die Trägermaterialien aufgebracht werden.

35

Ein Vernetzen löslicher Derivate der erfindungsgemäßen Polymere mittels geeigneter Vernetzungsreagentien in Gegenwart der festen organischen oder anorganischen Trägermaterialien führt ebenfalls zu Adsorbentien mit den erfindungsgemäßen Eigenschaften.

Weiterhin können die Oberflächeneigenschaften der Adsorbentien durch die zusätzliche Verwendung von weiteren Monomerkomponenten mit einer polymerisierbaren Doppelbindung beeinflusst werden. So kann man beispielsweise durch den Einsatz von Vinylacetat und dessen Hydrolyse nach der 5 Polymerisation das Benetzungsverhalten der Adsorbentien verbessern.

Die festen Adsorbentien können bevorzugt als loses Pulver oder als Filtermaterial, das modifiziert sein kann, zum Einsatz gelangen. Besonders bevorzugt ist ein Einsatz als Filtermatrix in Filterplatten. Beispielhaft sei eine Verwendung der 10 beschriebenen Adsorbentien in sogenannten „Spin columns“, d.h. in kleinen Chromatographiesäulen für die Handhabung in Tischzentrifugen, genannt.

Zur Anreicherung der DNA-haltigen Bestandteile können die funktionalisierten Adsorbentien vor; gleichzeitig oder nach der Lyse in das biologische Material, das 15 vorzugsweise in Form einer biologischen Lösung vorliegt, eingebracht werden. Der Zeitpunkt wird u.a. durch die Beschaffenheit der Adsorbentien bestimmt. Beispielsweise werden bei einer Verwendung als Filtermatrix die biologischen Proben vorzugsweise nach der Lyse mit den beschriebenen Adsorbentien kontaktiert, so dass die DNA-haltigen Bestandteile an die funktionalisierten 20 Oberflächen binden können.

Als loses Pulver werden die festen Adsorbentien vorzugsweise in Gegenwart der Lysereagenzien in die biologischen Materialien eingebracht. Das biologische Material wird lysiert und die DNA-haltigen Bestandteile des Probenmaterials 25 binden an die funktionalisierten Oberflächen.

Biologische Materialien in Sinne dieser Erfindung können Körperflüssigkeiten sein, wie z.B. Blut, Urin oder Cerebrospinalflüssigkeit. Darüber hinaus können als weitere biologische Materialien z.B. auch Plasma, Zellen, *Buffy coat*, 30 Leukocytenfraktionen, Sputum, Sperma oder Organismen (Einzeller, wie z.B. Eukaryonten oder Prokaryonten, Mehrzeller, Insekten usw.) verwendet werden. Weiterhin können zu diesen biologischen Materialien Kulturen von Mikroorganismen, zellhaltige Materialien, wie z.B. Gewebe oder Bodenproben, Bestandteile von Pflanzen oder anderen Organismen gehören. Besonders eignet 35 sich das erfindungsgemäße Verfahren für die Anreicherung DNA-haltiger Bestandteile in Blut (humanes Vollblut), *Buffy coat*, Leukocytenfraktionen und Zellkulturen.

DNA-haltige Bestandteile im Sinne dieser Erfindung sind vorzugsweise Zellkerne und andere DNA-haltige Organellen, wie z.B. Mitochondrien, Chloroplasten oder im Probenmaterial enthaltenen DNA-haltige Proteinkomplexe aber auch DNA-haltige Viren wie das Hepatitis C Virus, das Cytomegalie-Virus u.a.

Die Lysereagentien bewirken gegebenenfalls einen osmotischen Schock und öffnen die Zellmembranen. Andere die Stabilität der Zellstruktur störende Lysebedingungen, wie z.B. mechanische Einwirkungen durch Kugelmühle, French Press, Ultraschall usw., ein enzymatischer Abbau von Zellwand bzw. Zellmembran durch zellwandlytische Enzyme und/oder die Wirkung oberflächenaktiver Substanzen sind ebenfalls denkbar.

Zur Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe eignen sich als Lysereagentien besonders Lösungen, die Detergentien enthalten, wie z.B. Triton X-100, Tween 20, Tween 80, NP-40 und Briej 35. Die Detergentien können sowohl als alleinige Komponente als auch in Kombination mit einem Komplexbildner aus der Reihe der chelatartigen Liganden und/oder mit einem nativen Kohlenhydrat verwendet werden, vorzugsweise mit einem Oligosaccharid, dass zu mindestens 50 % aus Glucoseeinheiten besteht, besonders bevorzugt mit einem Disaccharid, wie z.B. Saccharose. Weiterhin können ionische Detergentien, wie z.B. Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) oder Sodiumdodecylsulfat (SDS), Verwendung finden. Das anionische Detergenz SDS löst durch Micellenbildung Lipide aus der Zellmembran, deren zerstörte Struktur zelleigenen Enzymen Angriffspunkte zum weiteren Abbau der Zellwand bietet.

Gegebenenfalls können dem Lysereagenz – einzeln oder in Kombination – Salze ein- oder zweiwertiger Kationen zugesetzt sein und/oder zellwandlytische Enzyme, wie z.B. Glukansen, Proteasen, Zellulasen usw..

Erfindungsgemäß werden bevorzugt Lysereagentien eingesetzt, die 0.5 % v/v bis 5 % v/v Komplexbildner und/oder 0.5 % v/v bis 3 % v/v Detergenz umfassen, wobei ein Volumenanteil von 1.0 % v/v bis 1.5 % v/v an Detergenz bevorzugt ist. Besonders bevorzugt ist ein Lysereagenz, umfassend Triton, Saccharose und/oder Ethyldiamintetraacetat (EDTA). Ganz besonders bevorzugt ist ein Reagenz, enthaltend 0.5 M EDTA, 1 % v/v Triton X-100 und 2.5 M Saccharose.

Das Lysereagenz wird bevorzugt in Kombination mit magnetischen Mikropartikeln verwendet, die eine durch Acrylamid, Methacrylamid, Acrylsäurederivate und/oder polymerisationsfähige Säuren oder deren Derivate, vorzugsweise Sulfonsäure-Derivate, funktionalisierte Oberfläche zur Bindung der DNA-haltigen Bestandteile umfassen.

Überraschend erfolgt unter den Bedingungen einer partiellen Lyse, wie sie bei der Zerstörung der Zellmembran gegeben ist, eine Bindung DNA-haltiger Bestandteile, wie z.B. von Zellkernen, Mitochondrien, Chloroplasten oder DNA-haltigen Proteinkomplexen aber auch DNA haltiger Viren an das Adsorbens. Reine DNA bindet unter diesen Bedingungen nicht an das Adsorbens und ist in beispielhaften Untersuchungen bei Verwendung der beschriebenen Puffersysteme nicht isolierbar.

Die restlichen Bestandteile des Probenmaterials werden abgetrennt. In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahren werden nach einer Bindungszeit der DNA-haltigen Bestandteile von 1-10 Minuten, vorzugsweise nach 2-5 Minuten, die Adsorbentien mit den gebundenen DNA-haltigen Bestandteilen vom restlichen Probenmaterial abgetrennt. Die sich im Probenmaterial befindlichen DNA-haltigen Bestandteile werden entsprechend aufkonzentriert, wodurch das in ein Verfahren zur DNA-Isolierung eingehende Volumen drastisch reduziert werden kann. Mit dem vorliegenden Anreicherungsverfahren kann eine Volumenreduzierung auf mindestens 1/4 des ursprünglichen Probenvolumens erreicht werden, vorzugsweise auf 1/8, besonders bevorzugt auf weniger als 1/10.

Nach erfolgter Bindung werden die DNA-haltigen Bestandteile gegebenenfalls von den Adsorbentien eluiert. Eine eventuelle Elution der DNA-haltigen Bestandteile kann unmittelbar nach dem Verwerfen des lysierten Probenmaterials oder nach einer Zwischenlagerung erfolgen. Dazu findet beispielsweise ein kleines Volumen einer wässrigen Salzlösung mit definierter Ionenstärke Anwendung. Als Salze werden bevorzugt Alkalihalogenide und Erdalkalihalogenide, wie z.B. NaCl, KCl oder CaCl₂, besonders bevorzugt Lithium- oder Calciumhalogenide, und ganz besonders bevorzugt Lithiumchlorid und Calciumchlorid allein oder im Gemisch miteinander, verwendet. Die Salze können sowohl als alleinige Komponenten in wässriger Lösung oder als Bestandteile wässriger Pufferlösungen mit anderen Komponenten, wie z.B. dem Fachmann bekannten Detergentien oder

Komplexbildnern, in einer bevorzugten Konzentration von 0.01 M bis 3.5 M, vorzugsweise in einer Konzentration von 0.01 bis 1.0 M, zum Einsatz kommen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist das Volumen der zur Ablösung der DNA-haltigen Bestandteile benötigten Lösung deutlich geringer als das Ausgangsvolumen der biologischen Probe, so dass eine Konzentration der aufzureinigenden DNA erreicht wird und die Extraktion in kleinen Volumina z.B. mit Robotern vollautomatisch erfolgen kann.

10 Die so gebundenen DNA-haltigen Bestandteile können, gegebenenfalls nach Lagerung und Elution, einer an sich bekannten Aufreinigung und DNA-Isolierung, deren Durchführung auch vollautomatisch möglich ist, unterzogen werden. Diese Verfahren sind dem Fachmann bekannt. So kann beispielsweise nach Abtrennung in der Probe vorhandener Proteine, z.B. durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion, 15 die zu isolierende DNA präzipitiert werden durch die Zugabe von Salzen, z.B. Natriumacetat, oder durch Zugabe eines organischen Lösungsmittels, insbesondere Alkohol, wie z.B. Ethanol oder Isopropanol, oder über ein bekanntes Festphasenextraktionsprinzip, etwa der Bindung der DNA in Gegenwart von chaotropen Substanzen an silikatische Materialien, weiter aufgereinigt werden. Die 20 Aufreinigung kann auch durch Gelfiltration, Gelelution oder Ionenaustauscher erfolgen. Mehrere der vorgenannten Methoden können kombiniert werden.

Der erfindungsgemäße Anreicherungsschritt kann in ein vollautomatisches Verfahren integriert werden, da es nur von der technischen Gestaltung des eingesetzten Adsorbens abhängt, welches automatische Verfahren zur Anreicherung DNA-haltiger Bestandteile verwendet wird.

Die Erfindung soll nun anhand einiger Beispiele illustriert werden, ohne sie aber auf diese Beispiele zu beschränken.

30

Beispiel 1

Herstellung von funktionalisierten magnetischen Mikropartikeln

1 g magnetischer Mikropartikel, bestehend aus mit Glutardialdehyd [Bolto *et al.* 35 (1978) *J. Appl. Polym. Sci.* 2, 1977] vernetztem Polyvinylalkohol, werden im Verlauf von einer Stunde mit 10 ml 30%-igem Wasserstoffperoxid aktiviert. Die Partikel werden aus der Suspension abgetrennt und mit Wasser peroxidfrei.

gewaschen. Dann gibt man diese Partikel zu einer Lösung von 1.1 g Acrylamid und 0.5 g Styrensulfonsäure, die mit Natronlauge auf pH 7 gebracht wurde. Nach der Zugabe von 40 mg Eisen(II)-sulfat röhrt man 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Partikel werden dann abgesaugt, mit Wasser von restlichem Monomer und 5 nicht gepropften Polymer befreit und sind für die Anreicherung von DNA-haltigen Bestandteilen bereit.

Beispiel 2a

Anreicherung DNA-haltiger Bestandteile

10 10 mg der unter Beispiel 1 hergestellten Magnetpartikel werden in eine Mischung aus 2 ml Blut und 4 ml eines Lysepuffers, bestehend aus einer 2.5 M Lösung von Saccharose, die 1 % v/v Triton X-100 enthält, gegeben. Die Lösung wird innig gemischt, um die Magnetpartikel zu verteilen und 10 Minuten bei Raumtemperatur 15 inkubiert. Dann trennt man die Partikel durch Anlegen eines Permanentmagneten an die Gefäßwand ab und verwirft die Flüssigkeit im Gefäß, wobei man darauf achtet, keine Magnetpartikel zu verlieren.

Die Partikel mit den gebundenen DNA-haltigen Bestandteilen werden nun in 200 µl 1.5 M NaCl-Lösung resuspendiert. Wiederum werden die Magnetpartikel durch 20 Anlegen eines äußeren Magnetfeldes an der Gefäßwand gesammelt. Der Überstand kann nun weiteren Methoden zur Aufreinigung von DNA zugeführt werden.

Beispiel 2b

Anreicherung DNA-haltiger Bestandteile

25 10 mg der unter Beispiel 1 hergestellten Magnetpartikel werden in eine Mischung aus 2 ml Blut und 4 ml eines Lysepuffers, bestehend aus einer 2.5 M Lösung von Saccharose, die 1 % v/v Triton X-100 und 0.5 M EDTA enthält, gegeben. Die Lösung wird innig gemischt, um die Magnetpartikel zu verteilen und 10 Minuten 30 bei Raumtemperatur inkubiert. Dann trennt man die Partikel durch Anlegen eines Permanentmagneten an die Gefäßwand ab und verwirft die Flüssigkeit im Gefäß, wobei man darauf achtet, keine Magnetpartikel zu verlieren.

Die Partikel mit den gebundenen DNA-haltigen Bestandteilen werden nun in 200 µl 1.5 M NaCl-Lösung resuspendiert. Wiederum werden die Magnetpartikel durch 35 Anlegen eines äußeren Magnetfeldes an der Gefäßwand gesammelt. Der Überstand kann nun weiteren Methoden zur Aufreinigung von DNA zugeführt werden.

Beispiel 3**Lagerung der angereicherten DNA-haltigen Bestandteile**

5 Die Anreicherung erfolgt wie im Beispiel 2 beschrieben. Nach Abtrennung des Komplexes aus DNA-haltigen Bestandteilen und Partikeln vom Überstand durch Anlegen eines Permanentmagneten wird dieser Komplex bei Raumtemperatur bis 30°C mindestens eine Woche gelagert und danach einer DNA-Isolation zugeführt. Die Menge der isolierten DNA und deren Qualität entsprechen in der 10 Größenordnung den Parametern, die vergleichsweise bei sofortiger Extraktion unmittelbar nach der Anreicherung erzielt werden.

Eine weitere Lagerung eines Komplexes für eine weitere Woche bei 4°C vor der anschließenden DNA-Isolation zeigt gleiche Ergebnisse bezüglich der DNA-Menge und Qualität.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Anreicherung und Stabilisierung von DNA-haltigen Bestandteilen, dadurch gekennzeichnet, dass DNA-haltiges Probenmaterial in einem Lyse-Bindungspuffer-System, welches mindestens ein Lysereagenz und mindestens ein festes Adsorbens umfasst, partiell lysiert wird und die DNA-haltigen Bestandteile an das Adsorbens gebunden werden, wobei die Oberfläche des Adsorbens mit Polymeren funktionalisiert ist, die aus einem Trägerpolymer und/oder aus Säurekomponente(n) aus polymerisationsfähigen Säuren oder Derivaten von polymerisationsfähigen Säuren bestehen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Trägerpolymer polymerisationsfähige Säuren, vorzugsweise Acrylsäuren oder Methacrylsäuren, oder Derivate von polymerisationsfähigen Säuren, vorzugsweise Acrylamide, Methacrylamide oder Acrylsäureester, verwendet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Polymere Copolymere aus Trägerpolymer und Säurekomponente, letztere ausgewählt aus Sulfonsäuren, Phosphonsäuren oder Carbonsäuren, verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass Copolymere im Monomerverhältnis 9:1 bis 1:1, vorzugsweise 9:1 bis 3:1, von Trägerpolymer zu Säurekomponente, verwendet werden.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt der Säurekomponente im Reaktionsgemisch zwischen 10 % w/w und 50 % w/w, vorzugsweise zwischen 10 % w/w und 25 % w/w liegt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Säurekomponente ein Vinylsulfonsäurederivat verwendet wird, vorzugsweise Styrensulfonsäure.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet,
dass das Adsorbens aus organischen oder anorganischen festen
Trägermaterialien, an die die Polymere gebunden sind, besteht,
vorzugsweise Polystyren, Polysulfone, modifizierte oder unmodifizierte
Kieselgele, Polyester, Polycarbonate, Polyamide oder Polymere mit
Hydroxylgruppen, vorzugsweise Cellulose oder Polyvinylalkoholderivate.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Adsorbens
Mikropartikel mit einem mittleren Durchmesser von 1-100 µm,
vorzugsweise
1-30 µm, eingesetzt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass als
Adsorbens magnetische Mikropartikel eingesetzt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet,
dass das Lysereagenz mindestens ein Detergenz im Gemisch mit
mindestens einem nativen Kohlenhydrat, vorzugsweise einem
Oligosaccharid, und/oder mindestens einem Komplexbildner umfasst.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass ein
nichtionisches Detergenz verwendet wird, vorzugsweise Derivate aus den
Reihen Triton, Tween, NP-40 oder Gemische davon.
12. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass als
Oligosaccharid ein Disaccharid, vorzugsweise Saccharose, verwendet wird.
13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass als
Komplexbildner EDTA verwendet wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet,
dass das Lysereagenz Triton X-100, vorzugsweise 1 % v/v, Saccharose,
vorzugsweise 2.5 M, und/oder EDTA, vorzugsweise 0.5 M, umfasst.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet,
dass als DNA-haltiges Probenmaterial biologisches Material, vorzugsweise
Blut, Leukocytenfraktionen, *Buffy coat*, Urin, Serum, Plasma,

Zellsuspensionen von Mikroorganismen oder Aufschlüsse von Pflanzen, zum Einsatz kommen.

16. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als DNA-haltige Bestandteile Zellorganellen, vorzugsweise Zellkerne, Mitochondrien oder Chloroplasten, DNA-haltige Proteinkomplexe oder DNA-haltige Viren angereichert werden.
5
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die DNA-haltigen Komplexe mit Hilfe von wässrigen Salzlösungen, die bevorzugt Alkali- und Erdalkalihalogenide enthalten, von dem festen Adsorbens abgelöst werden.
10
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass Alkali- und/oder Erdalkalichloride, vorzugsweise Lithium- und/oder Calciumchlorid, in einer Konzentration von 0,01-3,0 M, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,01 bis 1,5M, eingesetzt werden.
15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/014015

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 92/22201 A (BAXTER DIAGNOSTICS INC) 23 December 1992 (1992-12-23) siehe S. 3, Z. 11-15, S. 9, Z. 12-20, S. 12, Bsp. 17, 29	1-18
Y	DE 199 12 799 A1 (AGOWA GESELLSCHAFT FUER MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNOLOGIE MBH) 16 September 1999 (1999-09-16) siehe Kol. 4, Z. 3-10, Kol. 6, Z. 4-10, 32-30, Bsp. 4	1-18 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 March 2005

Date of mailing of the international search report

07/04/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Grosskopf, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/014015

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SAFARK I ET AL: "Use of magnetic techniques for the isolation of cells" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B : BIOMEDICAL APPLICATIONS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 722, no. 1-2, 5 February 1999 (1999-02-05), pages 33-53, XP004156204 ISSN: 0378-4347</p> <p>-----</p>	
A	<p>ODABASI M ET AL: "Polyhydroxyethylmethacrylate-based magnetic DNA-affinity beads for anti-DNA antibody removal from systemic lupus erythematosus patient plasma" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 760, no. 1, 25 August 2001 (2001-08-25), pages 137-148, XP004273999 ISSN: 1570-0232</p> <p>-----</p>	
A	<p>LUNDBERG J O N ET AL: "High nitric oxide production in human paranasal sinuses" NATURE MEDICINE, vol. 1, no. 4, 1995, pages 370-373, XP008044959 ISSN: 1078-8956</p> <p>-----</p>	
A	<p>HARDINGHAM J E ET AL: "IMMUNOBead-PCR: A TECHNIQUE FOR THE DETECTION OF CIRCULATING TUMOR CELLS USING IMMUNOMAGNETIC BEADS AND THE POLYMERASE CHAIN REACTION" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 53, 1 August 1993 (1993-08-01), pages 3455-3458, XP000605489 ISSN: 0008-5472</p> <p>-----</p>	
A	<p>LEVISON P R ET AL: "Recent developments of magnetic beads for use in nucleic acid purification" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol. 816, no. 1, 7 August 1998 (1998-08-07), pages 107-111, XP004145838 ISSN: 0021-9673</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/014015

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

SEE ADDITIONAL SHEET PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT**PCT/ISA/210**

International application No.

PCT/EP2004/014015

Continuation of II.2**Claims:**

The method according to claim 1 includes a number of different features, each of which has itself been formulated so broadly and vaguely that it was not possible to carry out a meaningful search for any claim so formulated or for the combination of features (see, for example, "sample material containing DNA", "adsorbing agent", "functionalized with polymers"). In the dependent claims (for example, 2, 3, 7, 10, 15 and 17) individual features are specified, but the large number of equivalent alternatives mentioned in these claims yields an indeterminate number of independent combinations possible, for which, again, no search could be carried out.

Hence, the search had to be conducted primarily on the basis of the (only) features that are mentioned in the examples (i.e. on the basis of magnetic microparticles that are functionalized with styrene sulfonic acid and acrylamide and on the basis of blood as "DNA-containing constituent").

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. After entry into the regional phase before the EPO, however, an additional search can be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, Part C, VI, 8.5) if the deficiencies that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been remedied.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/014015

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9222201	A 23-12-1992	AU	654381 B2	03-11-1994
		AU	2238492 A	12-01-1993
		CA	2087976 A1	18-12-1992
		DE	69203080 D1	27-07-1995
		DE	69203080 T2	01-02-1996
		EP	0543988 A1	02-06-1993
		ES	2076773 T3	01-11-1995
		JP	2844263 B2	06-01-1999
		JP	6500358 T	13-01-1994
		WO	9222201 A1	23-12-1992
DE 19912799	A1 16-09-1999	NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/014015

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBiete

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 92/22201 A (BAXTER DIAGNOSTICS INC) 23. Dezember 1992 (1992-12-23) siehe S. 3, Z. 11-15, S. 9, Z. 12-20, S. 12, Bsp. 17, 29 -----	1-18
Y	DE 199 12 799 A1 (AGOWA GESELLSCHAFT FUER MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNOLOGIE MBH) 16. September 1999 (1999-09-16) siehe Kol. 4, Z. 3-10, Kol. 6, Z. 4-10, 32-30, Bsp. 4 ----- -/-	1-18

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

31. März 2005

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

07/04/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Grosskopf, R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014015

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SAFARK I ET AL: "Use of magnetic techniques for the isolation of cells" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B : BIOMEDICAL APPLICATIONS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, Bd. 722, Nr. 1-2, 5. Februar 1999 (1999-02-05), Seiten 33-53, XP004156204 ISSN: 0378-4347</p> <p>-----</p> <p>ODABASI M ET AL: "Polyhydroxyethylmethacrylate-based magnetic DNA-affinity beads for anti-DNA antibody removal from systemic lupus erythematosus patient plasma" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, Bd. 760, Nr. 1, 25. August 2001 (2001-08-25), Seiten 137-148, XP004273999 ISSN: 1570-0232</p> <p>-----</p> <p>LUNDBERG J O N ET AL: "High nitric oxide production in human paranasal sinuses" NATURE MEDICINE, Bd. 1, Nr. 4, 1995, Seiten 370-373, XP008044959 ISSN: 1078-8956</p> <p>-----</p> <p>HARDINGHAM J E ET AL: "IMMUNOBead-PCR: A TECHNIQUE FOR THE DETECTION OF CIRCULATING TUMOR CELLS USING IMMUNOMAGNETIC BEADS AND THE POLYMERASE CHAIN REACTION" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, Bd. 53, 1. August 1993 (1993-08-01), Seiten 3455-3458, XP000605489 ISSN: 0008-5472</p> <p>-----</p> <p>LEVISON P R ET AL: "Recent developments of magnetic beads for use in nucleic acid purification" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, Bd. 816, Nr. 1, 7. August 1998 (1998-08-07), Seiten 107-111, XP004145838 ISSN: 0021-9673</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. -
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. -
weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle Internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe BEIBLATT PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
Fortsetzung von Feld II.2	
Ansprüche Nr.: -	
<p>Das Verfahren gemäss Anspruch 1 beinhaltet eine Anzahl verschiedener Merkmale, wobei jedes dieser Merkmale für sich gesehen derart breit und vage formuliert ist, dass eine sinnvolle Recherche für einen derartig formulierten Anspruch oder die Kombination der Merkmale nicht möglich war (siehe z. B. "DNA-haltiges Probenmaterial", "Adsorbens", "mit Polymeren funktionalisiert"). In den abhängigen Ansprüchen (z.B. 2, 3, 7, 10, 15 und 17) werden zwar jeweils einzelne dieser Merkmale spezifiziert, jedoch ergeben sich auf Grund der Vielzahl der in diesen Ansprüchen erwähnten alternativen Möglichkeiten eine nicht zu bestimmende Anzahl unabhängiger Kombinationsmöglichkeiten, für die ebenfalls keine Recherche durchgeführt werden konnte.</p> <p>Somit mussste die Recherche primär ausgehend von den (einzigsten) Merkmalen, die in den Beispielen Erwähnung finden durchgeführt werden (d.h. auf Grund von magnetischen Mikropartikeln, die mit Styrensulfonsäure und Acrylamid funktionalisiert sind und auf Grund von Blut als "DNA-haltigem Bestandteil").</p> <p>Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit, der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäss Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-VI, 8.5), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäss Art. 17 (2) PCT geführt haben.</p>	

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014015

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9222201	A	23-12-1992	AU	654381 B2		03-11-1994
			AU	2238492 A		12-01-1993
			CA	2087976 A1		18-12-1992
			DE	69203080 D1		27-07-1995
			DE	69203080 T2		01-02-1996
			EP	0543988 A1		02-06-1993
			ES	2076773 T3		01-11-1995
			JP	2844263 B2		06-01-1999
			JP	6500358 T		13-01-1994
			WO	9222201 A1		23-12-1992
DE 19912799	A1	16-09-1999		KEINE		